

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①⑪ N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 722 295

②① N° d'enregistrement national :

94 08402

⑤① Int Cl⁶ : G 01 N 27/447, 33/68, C 12 Q 1/68

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 07.07.94.

③⑦ Priorité :

④③ Date de la mise à disposition du public de la
demande : 12.01.96 Bulletin 96/02.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule.*

⑥⑦ Références à d'autres documents nationaux
apparentés : DIVISION DEMANDÉE LE 09/08/95
BÉNÉFICIAIRE DE LA DATE DE DÉPÔT DU
09/12/94 DE LA DEMANDE INITIALE N° 94 14830
(ARTICLE L.612-4) DU CODE DE LA PROPRIÉTÉ
INTELLECTUELLE

⑦① Demandeur(s) : INSTITUT GUSTAVE ROUSSY —
FR.

⑦② Inventeur(s) : BRESSAC DE PAILLERETS
BRIGITTE, LAZAR VLADIMIR et BELLET
DOMINIQUE.

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire : REGIMBEAU.

⑤④ MÉTHODE D'ANALYSE D'ADN DITE SSCP ET GEL D'ELECTROPHORENE.

⑤⑦ La présente invention a pour objet une méthode d'ana-
lyse des polymorphismes de conformation simple brin
d'ADN, dite méthode SSCP, caractérisée en ce qu'on uti-
lise un gel d'électrophorèse de faible force ionique. De pré-
férence on utilise en outre un tampon de migration de faible
force ionique.

FR 2 722 295 - A1



La présente invention concerne une méthode d'analyse des polymorphismes de conformation simple-brin d'ADN encore appelée méthode SSCP (Single-Strand conformation polymorphism analysis)

5 D'infimes variations dans la séquence nucléotidique d'un gène permettent de faire la distinction entre cellules anormales et cellules normales chez des patients atteints d'une maladie liée à des modifications héréditaires ou sporadiques du génome. Ainsi on sait que l'accumulation de plusieurs modifications génétiques au niveau d'oncogènes ou de gènes
10 supprimeurs de tumeur sont nécessaires à la genèse des cancers chez l'homme. Ces modifications de l'ADN observées dans des cellules cancéreuses peuvent être des altérations touchant de larges régions du génome, comme c'est le cas pour des amplifications, des réarrangements et des pertes de gènes, ou les modifications de l'ADN peuvent porter sur de
15 courtes séquences nucléotidiques. Il s'agit en particulier des substitutions d'une seule base, des délétions ou des insertions d'un ou de quelques nucléotides. Les altérations touchant de larges régions peuvent être détectées par simple hybridation en "Southern blot". En revanche, peu de méthodes simples, fiables et rapides existent pour la détection des
20 mutations ponctuelles.

La méthode d'analyse SSCP décrite par Orita et al. (1,2) permet de mettre en évidence des mutations ponctuelles.

Dans la méthode SSCP deux séquences simple-brin complémentaires sont séparées par électrophorèse en gel de polyacrylamide non-
25 dénaturant. La migration différentielle est fonction de la structure tertiaire, et donc de la séquence nucléotidique de chaque brin. Des fragments d'ADN simple-brin de même longueur se différenciant par la substitution d'une base, ont des migrations électrophorétiques différentes en gel de polyacrylamide non-dénaturant. La différence de mobilité est
30 attribuée à une différence de conformation tertiaire, celle-ci étant changée par le changement d'une seule base. On appelle cette caractéristique : polymorphisme de conformation simple-brin ou SSCP. L'utilisation combinée de la PCR et d'une analyse SSCP constitue de ce fait une méthode simple et sensible pour la détection de mutations ponctuelles.
35 Cette méthode est appelée PCR-SSCP.

Dans cette méthode PCR-SSCP, le matériel amplifié est chauffé pour dénaturer l'ADN double-brin puis chargé sur gel de polymère tel que polyacrylamide non dénaturant. Les modifications de mobilité de l'un ou des deux brins complémentaires visibles sur l'autoradiographie, révèlent la présence d'une substitution de base sur l'un des allèles. L'analyse PCR-SSCP est une méthode simple et sensible permettant d'assurer la détection de modifications des séquences nucléotidiques d'ADN génomique et d'ADNc. Il est possible de détecter des substitutions de base, des insertions ou des délétions de courte séquence ainsi que des pertes alléliques de gène. Cette méthode est donc adaptée à l'analyse de l'ADN et de l'ARN pour les cancers et les maladies génétiques chez l'homme.

L'un des avantages de la technique PCR-SSCP est en effet la sensibilité atteinte par le test puisque des altérations de l'ADN peuvent être détectées à partir d'un très petit nombre de cellules affectées dans l'échantillon. Une substitution d'une base sur un des allèles se visualise par une modification de la mobilité du brin. Une analyse PCR-SSCP peut également permettre de détecter la perte de gènes. En effet, si des modifications de mobilité liées à une mutation ponctuelle polymorphe peuvent être observées sur de l'ADN de cellules normales, une disparition de ces signaux (générés par l'un des deux allèles) sur des cellules tumorales du même individu indique une perte d'un allèle du gène dans la tumeur. L'absence des signaux correspondant à une séquence normale indique donc la perte d'un des allèles. Une analyse PCR-SSCP peut révéler par conséquent, deux types de modifications génétiques dans des cellules tumorales : perte d'un allèle et mutation sur l'allèle restant. L'analyse PCR-SSCP est également capable d'assurer la détection d'ARNm muté. Pour ce faire, l'ARNm extrait à partir de cellules est converti en ADNc à l'aide d'une reverse transcriptase, puis cet ADNc est analysé par PCR-SSCP. L'analyse PCR-SSCP a été utilisée pour détecter des altérations de l'ADN dans des cancers humains ; mutations activant le gène ras dans des cancers du poumon et mutations inactivant des gènes suppresseurs de tumeur, tels que RB et P53, dans différentes variétés de cancers. La méthode SSCP a également joué un rôle important dans l'identification des gènes responsables des maladies héréditaires chez l'homme : le gène CFTR (pour "Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator")

responsable de la fibrose cystique, le gène de la neurofibromatose de type 1 (NF1) et le gène de l'adéno-polypose colique (APC).

La méthode de PCR-SSCP est donc particulièrement efficace pour détecter toute variation de l'ordre de quelques bases dans la séquence de l'ADN, parmi lesquelles les substitutions d'une base qui sont difficilement
5 détectées par d'autres techniques.

Un autre avantage certain de l'analyse PCR-SSCP est que l'on obtient, en fin d'expérience, une séparation physique des fragments mutés qui pourront ensuite être purifiés. Après autoradiographie du gel
10 sec, un minuscule fragment du gel, correspondant à la bande intéressante, est découpé, l'ADN en est extrait, puis amplifié par PCR. L'analyse par séquençage de ce produit PCR permet finalement d'identifier la mutation sur le gène cible.

La sensibilité de la méthode PCR-SSCP permet en principe la
15 détection de mutation ponctuelle dans un fragment d'ADN jusqu'à 900 paires de base. Toutefois en pratique l'efficacité de la méthode pour la détection des mutations ponctuelles pour des fragments de plus de 300 paires de base est inférieure à 90 % (4).

Ainsi, il a été décrit une détection de 100 % des mutants du gène de
20 beta-globine de souris sur des fragments d'ADN de 193 bp (8), alors que 87 % des mutations n'étaient détectées que dans des fragments de 354 bp (4). Une efficacité de 90 % a été rapportée sur des fragments de gène p53 de 202 à 309 bp. A ce jour, il est donc recommandé d'effectuer une analyse PCR-SSCP sur des fragments inférieurs à 300 bp pour garantir une
25 fiabilité à 100 %.

Des milieux électrophorétiques et gels d'électrophorèse préparés avec des monomères du type acrylamide ont été décrits dans la demande de brevet européen EP 0339 678.

On a découvert selon la présente invention, que la force ionique de
30 la composition du gel d'électrophorèse utilisé pour la mise en oeuvre de l'analyse SSCP affecte la mobilité des ADN simple-brins. Plus particulièrement, on a découvert que la diminution de la force ionique de la composition du gel améliore de façon considérable la résolution des SSCP, c'est-à-dire la capacité de séparation électrophorétique de deux
35 brins d'ADN de même taille se distinguant par une simple substitution d'une base.

La présente invention démontre donc que l'opinion admise jusqu'à ce jour selon laquelle la séparation électrophorétique observée est liée à la seule différence de conformation tertiaire adoptée par des brins d'ADN repliés n'est pas exacte.

5 La présente invention fournit ainsi des perfectionnements de la méthode d'analyse SSCP qui permettent de détecter 100 % d'altérations génétiques mineures, y compris les mutations ponctuelles, délétions ou insertions courtes, dans des fragments, plus de 300 notamment, de 300 à 500 nucléotides.

10 Plus précisément la présente invention a pour objet une méthode d'analyse des polymorphismes de conformation simple brin d'ADN, dite SSCP, caractérisée en ce qu'on utilise un gel d'électrophorèse de faible force ionique.

15 En particulier le gel électrophorèse est préparé à l'aide d'un tampon de faible force ionique.

De préférence on utilise en outre un tampon de migration de faible force ionique, lorsque l'on effectue une électrophorèse.

20 On entend ici par "faible force ionique", une concentration molaire en gels réduite par rapport aux concentrations décrites dans la littérature pour effectuer une électrophorèse SSCP avec le gel et/ou les tampons de migration en question.

Dans un mode de réalisation le gel d'électrophorèse est préparé avec un tampon TBE (Tris-Borate, EDTA).

25 De même, dans un mode de réalisation le tampon de migration est un tampon TBE (Tris-Borate, EDTA).

Le tampon TBE est le tampon d'électrophorèse le plus couramment utilisé. En effet, ce tampon est particulièrement résistant à l'effet Joule intervenant lors des migrations sous forte tension.

On peut aussi utiliser dans les deux cas du TAE (Tris-Acetate, EDTA).

30 Lorsque le tampon intrinsèque entrant dans la composition du gel est le TBE, on utilise un tampon dilué à plus de 1/2 (inférieur à 0,5 X) à 1/10ème (0,1 X) par rapport à la concentration de TBE 1 X (Tris-base de 0,09 M, Acide Borique 0,09 M et EDTA 0,002 M). On utilise en particulier un tampon TBE (0,4 X).

35 Dans le tampon TBE intrinsèque on entend donc par "faible force ionique" une concentration molaire en contre-ions négatifs borate inférieurs à 45 mM.

De même, de façon appropriée, le tampon de migration est un même tampon TBE 1 X (Tris-Borate 0,09 M et EDTA 0,002 M) à concentration molaire diluée au 1/10ème (0,1 X) à 1/20ème (0,05 X). Dans le tampon TBE de migration on entend donc par "faible force ionique" une concentration molaire en ions borate inférieurs à 9mM.

De façon classique, le gel d'électrophorèse est un gel de polyacrylamide préparé avec des monomères de type acrylamide, notamment acrylamide et bisacrylamide.

De préférence lorsque le gel est un gel de polyacrylamide, il s'agit d'un gel à concentration finale en polyacrylamide de 2 à 12 %, notamment de 6 %.

La présente invention a également pour objet un gel d'électrophorèse préformé à usage unique utile pour la mise en oeuvre d'une méthode selon l'invention, caractérisé en ce qu'il est préparé à partir d'un tampon de faible force ionique, comme caractérisé ci-dessus.

Enfin, la présente invention a pour objet une trousse de réactifs pour la mise en oeuvre d'une méthode d'électrophorèse SSCP selon l'invention comportant un gel liquide prêt à être polymérisé selon l'invention et un tampon de migration tel que caractérisé ci-dessus.

D'autres caractéristiques et avantages de la présente invention apparaîtront à la lumière d'un mode détaillé de réalisation qui montre une efficacité de 100 % dans la détection de mutations dans des fragments de 204 à 358 bp comme attesté par comparaison entre les données de séquençage direct et de SSCP.

La Figure 1 montre que la modification de la composition du gel et du tampon de migration selon la présente invention augmente considérablement la sensibilité et l'amplitude des déplacements des bandes de SSCP.

(A) = gel (TBE 1X) et tampon de migration (TBE 1X) classiques et ;
(B) = gel (TBE 0,4X) et tampon de migration (TBE 0,1X) à force ionique réduite.

La Figure 2 présente la détection d'une substitution d'un seul nucléotide dans un fragment de 341 bp du gène APC.

1. Matériel et méthode

L'ADN utilisé a été obtenu à partir de fragments tumoraux ou de lymphocytes PBMC de patients par la méthode de digestion à la protéinase K et extraction au phénol/chloroforme.

Les amorces utilisées pour l'amplification par PCR ont été conçues à l'aide du logiciel OLIGO - Société MEDPROBE, Oslo, Norvège -. Elles permettent d'amplifier tous les exons du gène p53 et ainsi de générer des fragments de 204 bp (exon 7) à 358 bp (exon 4). La région codante entière du gène APC a été divisée en 41 segments entre 198 et 356 bp. Pour ces deux gènes, chaque segment a été amplifié séparément en ayant recours au protocole de PCR suivant.

50 ng d'ADN génomique sont amplifiés avec des dNTPs 5 μ M (Pharmacia), du MgCl₂ 1,25 à 1,5 mM (Perkin), des tampons de PCR 1X (Perkin), 3 picomol de chaque amorce, 2 μ Ci de α^{33} P dATP (Amersham) et 0,5 unités de Taq polymérase (Perkin) dans un volume de réaction de 20 μ l. L'amplification est réalisée en 30 cycles de 30 s à 94°C, 30 s à 56°C (pour le gène p53) ou 52°C (pour le gène APC) (APC = adenomatous polyposis coli) et 30 s à 72°C.

Après le dernier cycle, 1 à 2 μ l de produit d'amplification sont dilués dans 9 μ l de solution tampon A (SDS 0,1 % et EDTA 10mM/pH 8).

Ensuite, 10 μ l de solution tampon B (formamide déionisée à 95 %, bleu de bromophénol 0,05 %, xylène cyanole 0,005 % et EDTA 20 mM/pH8) sont ajoutés aux produits de PCR dilués. Le mélange est ensuite dénaturé par chauffage à 90°C pendant 2 minutes puis placé dans la glace pendant 3 minutes avant d'être déposé sur deux gels :

- l'un avec glycérol pour des migrations à température ambiante ;
- l'autre sans glycérol pour des migration à 4°C.

30

On a utilisé un gel hydrolinkTM MDETTM et un gel équivalent de polyacrylamide 6% à une concentration en polymère équivalente à celle proposée par le fabricant (BIOPROBE). Mais la force ionique de la composition est diminuée car le tampon TBE utilisé, est à une concentration d'environ 0,40X (au lieu de 0,6 X) pour la préparation du gel. Plus précisément, on utilise du TBE 0,38X pour le gel sans glycérol destiné à

35

la migration à 4°C et TBE 0,41X pour le gel avec glycérol destiné à la migration à température ambiante.

Les autres composants pour la préparation du gel sont utilisés dans les conditions recommandées par le fabricant (voir Tableau 1).

5 La composition du tampon TBE 10X est la suivante :

	- Tris	108 g (0,9 M) ;
	- Acide borique	55 g (0,9 M) ;
	- EDTA - 0,5 M - pH 8	40 ml (0,02 M) ;
10	- H ₂ O (qs)	1 l

TBE 1X = Dilution au 1/10ème du TBE 10X, soit les concentrations finales suivantes :

15	- Tris	90 mM
	- Acide borique	90 mM
	- EDTA, pH 8	2mM

20 Une autre modification a porté sur la diminution de la force ionique du tampon d'électrophorèse ou tampon de migration qui est de 0,05 X à 0,1 X TBE au lieu d'un TBE de 0,5 X à 1 X de TBE utilisé dans la littérature.

Tableau 1

COMPOSANTS	GEL 4°C sans glycérol	GEL 20°C avec glycérol
5 gel Hydrolink MDE™ ou gel acrylamide *	17,5 ml	17,5 ml
TBE 10 X	3 ml (0,38X)	3,5 ml (0,42X)
Glycérol	0	6,4 ml
10 H ₂ O ultrapure	57 ml	57 ml
Solution de persulfate d'amonium à 10 %	300 µl	300 µl
Temed **	45 µ	45 µ
TOTAL	78 ml	85 ml

15

* : solution mère de 30 % d'acrylamide avec un rapport
acrylamide/bisacrylamide de 29/1

** : agent de polymérisation

20 L'utilisation d'un gel de polyacrylamide 6 % polymérisé avec du
persulfate d'amonium et du TEMED (tetraethymamine diamine) au lieu du
gel hydrolink MDE™ dans les mêmes conditions, a donné exactement les
mêmes résultats.

Préparation du gel :

25 Dans un becher contenant l'eau desionisée, on mélange la solution
de polymère et le tampon TBE. Puis on ajoute le TEMED, le cas échéant le
glycérol, et la solution de persulfate d'amonium. Puis on mélange. On
introduit le mélange à l'extrémité des plaques d'électrophorèse de manière
à faire couler le mélange entre les plaques. On attend environ 1 heure de
30 polymérisation avant de commencer l'électrophorèse.

Dispositif d'électrophorèse :

On réalise une électrophorèse avec un dispositif constitué de deux

plaques de support en verre que l'on dégraisse puis assemble. On place un peigne à l'une des extrémités du support et on coule le gel dans l'espace ménagé entre les deux plaques de verre à température ambiante.

L'électrophorèse des gels a été effectuée à 10 Watts pendant 16 heures. Les gels sont transférés sur du papier Whatman, laissés à sécher pendant 30 minutes puis exposés à l'autoradiographie pendant 2 à 12 heures sans écran intensificateur.

2. Résultats

2.1. Analyse SSCP des échantillons de p 53

Un grand nombre d'échantillons d'ADN a été testé en parallèle quant à leurs mutations sur le gène p53 par séquençage et par SSCP.

Tous les résultats négatifs par SSCP correspondent à des séquences de type sauvage, déterminées par séquençage direct effectué sur des produits de PCR (ADN monobrin). Tous les échantillons déplacés par SSCP correspondent à des substitutions d'une seule base, qui sont soit des mutations vraies ou des polymorphismes. La corrélation entre SSCP et séquençage direct est de 100 % à la fois pour les échantillons négatifs (N = 539) et les échantillons positifs (N = 70). Des mutations ou polymorphismes identiques ont été détectés dans plusieurs échantillons montrant la reproductibilité de la méthode. Des résultats positifs correspondant à des variations dans la séquence du gène p53 (N = 30) sont présentés au Tableau 2 ci-après. Ces résultats indiquent que la méthode SSCP selon l'invention permet de détecter toute modification de la séquence du gène p53.

Tableau 2 : détection par SSCP des variations de la séquence du gène p53 identifié par séquençage :

T	= ADN extrait de tumeur
Ly	= Extrait de lymphocytes
nt	= nucléotide
+ à +++	= intensité du déplacement
bp	= paire de bases

2.2. Analyse SSCP du gène APC

5 L'analyse du gène APC permet de détecter les prédispositions
génétiques pour la FAP (Familial Adenomatous Polyposis). Etant
donné la longueur du gène qui rend très difficile un séquençage
systématique, la méthode SSCP est le seul procédé de détection
possible dont les résultats sont présentés au Tableau 3.

10 On obtient là encore une corrélation de 100 % entre la méthode SSCP
selon l'invention et le séquençage direct. Pour chaque bande on
associe un événement génétique tel qu'une mutation ponctuelle,
une délétion ou insertion. La sensibilité de la méthode permet de
détecter la substitution d'un seul nucléotide sur un fragment de
341 bp. La séquence de l'échantillon déplacé a été altérée (CAG ->
TAG au nucléotide 2101) avec l'apparition d'un codon non sens à la
15 position 696 du gène APC (Figure 2).

Tableau 2

Identification de l'échantillon	Exon du Gène p53	Taille du Fragment	Codon du Gène p53	Variation dans la séquence	Détection SSCP
ADN 297 Ly	Intron 2	214 bp	nt 11827	G->C	++
SEI 35 T	4	358 bp	72	GGC->OCC	+++
SEI 27 T	4	358 bp	105	GGC->GTC	+
CUR 1 Ly	5	303 bp	151	1 bp deletion	+++
CUR 2 Ly	5	303 bp	153	CCG->CCA	+++
SEI 590 T	5	303 bp	176	TGC->AGC	+++
SEI 16 T	6	331 bp	196	CGA->CTA	++
CEI T	6	331 bp	213	CGA->CGG	+++
SEI 29 T	6	331 bp	216	GTG->TTG	++
SEI 77 T	6	331 bp	220	TAT->TGT	++
MUTU 1 Ly	7	204 bp	234	TAC->AAC	++++
SEI 31 T	7	204 bp	245	GGC->GAC	++++
SF 245 T	7	204 bp	245	GGC->TGC	++++

5

10

15

20

25

30

35

Tableau 2 (suite)

Identification de l'échantillon	Exon du Gène p53	Taille du Fragment	Codon du Gène p53	Variation dans la séquence	Détection SSCP
SEI 7 T	7	204 bp	248	CCG -> CAG	++++
SEI 542 T	7	204 bp	248	CCG -> TCG	++
29 T	7	204 bp	249	ACG -> AGT	++++
SF 258 T	7	204 bp	258	GAA -> AAA	++++
CUR 3 Ly	8	255 bp	272	GTG -> ATG	++
ADN 158 Ly	8	255 bp	273	CGT -> GGT	++
CUR 4	8	255 bp	273	CGT -> TGT	++
CUR 5	8	255 bp	273	CGT -> CAT	++
SEI 137 T	8	255 bp	274	GTT -> GCT	+
SEI 589 T	8	255 bp	278	OCT -> TCT	++
SEI 12 T	8	255 bp	280	AGA -> GCA	++
258350	8	255 bp	281	GAC -> CAC	++
SEI 28 T	8	255 bp	282	CCG -> TCG	++
ADN 306 Ly	Intron 9	238 bp	nt 14766	T -> C	+
ADN 715 Ly	10	198 bp	338	TTC -> TTT	+
ADN 123 Ly	10	198 bp	342	CGA -> TGA	++
ADN 564 Ly	Intron 10	198 bp	nt 17708	A -> T	+

Tableau 3

Identification de l'échantillon	Exon du Gène APC	Taille du Fragment	Variation de Séquence
SG 39	3	298 bp	AGA -> TGA at nt 376 : Arg -> Stop
SG 91	3	298 bp	TAT -> TAG at nt 306 : Tyr -> Stop
SG 39	5	349 bp	A -> T in intron 4
SG 117	9.1	299 bp	2 bp deletion at nt 1116
SG 9	9.2	237 bp	GAG -> TAG at nt 1282 : Glu -> Stop
SG 57	11	325 bp	C -> T at nt 1476 : silent
SG 101T	11	325 bp	1 bp deletion in intron 11
SG 115	12	198 bp	G -> A at nt 1572 : silent
SG 176	13	254 bp	CGA -> TGA at nt 1707 : Arg -> Stop
SG 135T	13	254 bp	CGA -> TGA at nt 1678 : Arg -> Stop
IGR 252	14	354 bp	4 bp deletion at nt 1892
SG 61	15-1	341 bp	CAG -> TAG at nt 2101 : Gln -> Stop
SG 101T	15-1	341 bp	A -> T in intron 14
SG 21	15-2	316 bp	CGA -> TGA at nt 2431 : Arg -> Stop
SG 111	15-3	262 bp	4 bp deletion at nt 2562
SG 255	15-3	262 bp	GAA -> TAA at nt 2695 : Glu -> Stop
SG 101T	15-3	262 bp	CGA -> TGA at nt 2644 : Arg -> Stop

Tableau 3 (suite)

Identification de l'échantillon	Exon du Gène APC	Taille du Fragment	Variation de Séquence
SG 329	15-5	276 bp	CCA -> CCG at nt 3021 : silent
SG 32	15-5	276 bp	1bp deletion at nt 3095
LOVO	15-6	260 bp	CGA -> TGA at nt 3358 : Arg -> Stop
SG 34	15-7	330 bp	4bp deletion at nt 3462
SG 188	15-9	312 bp	5 bp deletion at nt 3945
SG 262	15-9	312 bp	CAG -> TAG at nt 4030 : Gln -> Stop
SG 314	15-9	312 bp	5 bp deletion at nt 3938
SG 101 T	15-9	312 bp	CGA -> GCG at nt 3993 : silent
LOVO	15-10	331 bp	1 bp deletion at nt 4308
SG 135T	15-10	331 bp	AGT -> ATT at nt 4262 : Ser -> Ile
SG 135T	15-11	268 bp	2 bp insertion at nt 4412
SG 205	15-11	268 bp	ACG -> ACA at nt 4497 : silent
COLO 205	15-12	324 bp	1 bp insertion at nt 4685
SG 32	15-13	305 bp	CAT -> GAT at nt 4903 : His -> Asp
SG 129	15-15	316 bp	GAC -> GTCat nt 5483 : Asp -> Val
SG 22	15-17	356 bp	1 bp deletion at nt 6068

BIBLIOGRAPHIE

1. Orita, M., Iwahana, H., Kanazawa, H., Hayashi, K., & Sekiya, T.
5 Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as
single-strand conformation polymorphisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86,
2766-2770 (1989).
2. Orita, M., Suzuki, Y., Sekiya, T. & Hayashi, K. Rapid and
sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the
10 polymerase chain reaction. *Genomics*. 5, 874-879 (1989).
3. Cai, Q-Q. & Touitou, I. Excess PCR primers may dramatically
affect SSCP efficiency. *Nucleic Acids Res.* 21, 3909-3910 (1993).
4. Fan, E., Levin, D.B., Glickman, B.W. & Logan, D.M. Limitations
in the use of SSCP analysis. *Mutat. Res.* 288, 85-92 (1993).
- 15 5. Michaud, J., Brody, L.C., Steel, G., et al. Strand-separating
conformational polymorphism analysis : efficacy of detection of point
mutations in the human ornithine-d-aminotransferase gene. *Genomics* 13,
389-394 (1992).
6. Condie, A., Eeles, E., Borresen, A.L., Coles, C., Cooper, C., &
20 Prosser, J. Detection of point mutations in the p53 gene : comparison of
single-strand conformation polymorphism, constant denaturant gel
electrophoresis, and hydroxylamine and osmium tetroxide techniques.
Hum. Mutat. 2, 58-66 (1993).
7. Glavac, D. & Dean, M. Optimization of the single-strand
25 conformation polymorphism (SSCP) technique for detection of point
mutation. *Hum. Mutat.* 2, 404-414 (1993).

REVENDICATIONS

1. Méthode d'analyse des polymorphismes de conformation
5 simple brin d'ADN, dite méthode SSCP, caractérisée en ce qu'on utilise un
gel d'électrophorèse de faible force ionique.
2. Méthode selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'on
10 utilise un tampon de migration de faible force ionique.
3. Méthode selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que
le gel d'électrophorèse non dénaturant contient un tampon intrinsèque de
faible force ionique.
- 15 4. Méthode selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en
ce que le gel d'électrophorèse contient un tampon TBE (Tris-Borate, EDTA).
5. Méthode selon l'une des revendications 2 à 4, caractérisée en
ce que le tampon de migration, est un tampon TBE (Tris-Borate, EDTA).
20
6. Méthode selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisée en
ce que le gel d'électrophorèse, est un gel préparé avec un polymère
d'acrylamide.
- 25 7. Méthode selon la revendication 6, caractérisée en ce que la
concentration en polyacrylamide est de 2 à 12 %.
8. Méthode selon la revendication 4, caractérisée en ce que le
tampon TBE entrant dans la composition du gel est un tampon TBE 1 X (Tris-
30 BORATE 0,09 M et EDTA 0,002 M) dilué à plus de 1/2 (inférieur à 0,5 X) à
1/10ème (0,1 X).
9. Méthode selon l'une des revendications 2 à 8, caractérisée en
ce que le tampon de migration est un tampon TBE 1 X (Tris-Borate 0,09 M et
35 EDTA 0,002 M) dilué au 1/10ème (0,1 X) à 1/20ème (0,05 X).

10. Gel d'électrophorèse préformé à usage unique utile pour la mise en oeuvre d'une méthode selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisé en ce qu'il est préparé à partir d'un tampon à faible force ionique.

5

11. Gel d'électrophorèse selon la revendication 10, caractérisé en ce qu'il comporte :

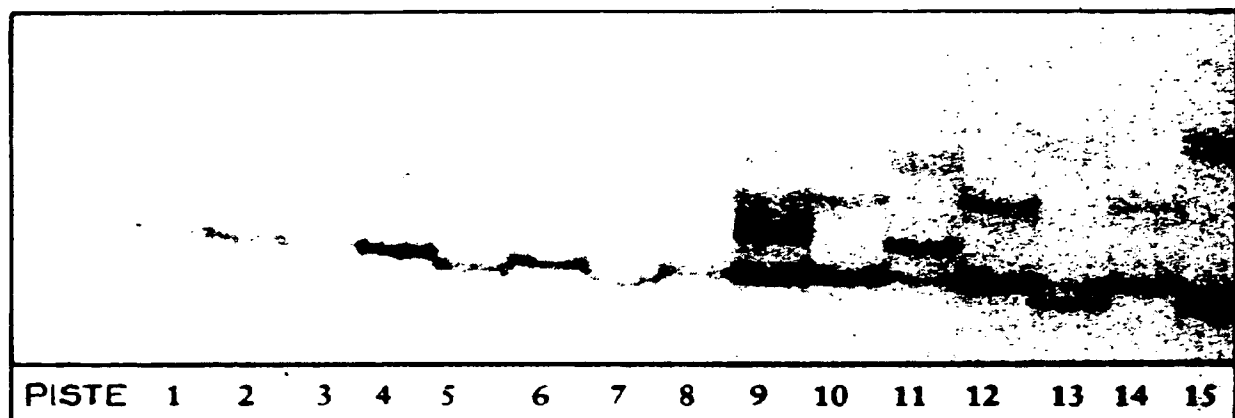
- un polymère polyacrylamide à concentration de 2 à 12 % et ;
- un tampon TBE selon la revendication 8.

10

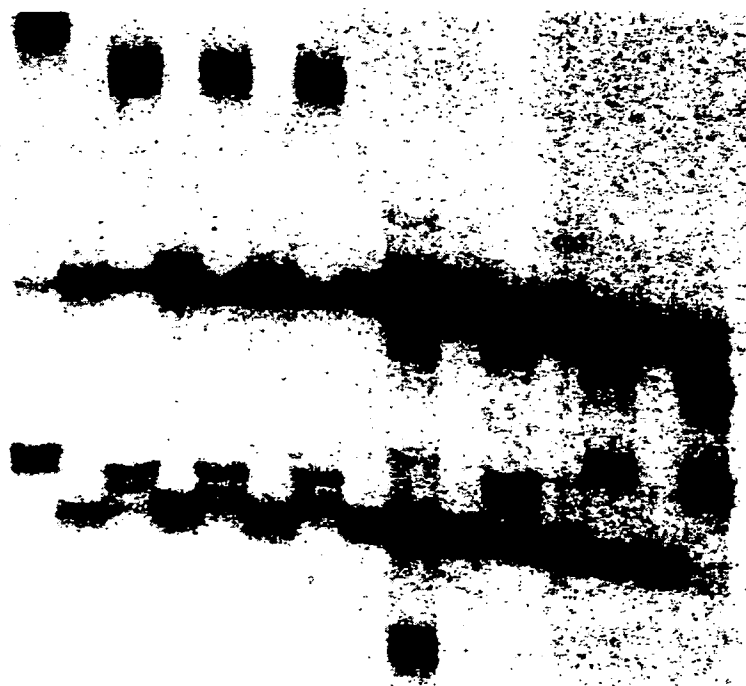
12. Trousse de réactifs pour mettre en oeuvre une méthode selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisé en ce qu'il comporte un gel selon la revendication 10 ou 11 et un tampon de migration selon les revendications 2, 5 ou 9.

1 / 2

A



B

FIG.1

2 / 2



FIG. 2

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
Y	US-A-4 904 366 (J. TOKITA) * colonne 5, ligne 11 - ligne 26 * ---	1
Y	US-A-4 209 372 (B. I. BLUESTEIN) * colonne 2, ligne 58 * * colonne 3, ligne 43 * ---	1
A	US-A-4 983 268 (F. H. KIRKPATRICK) * colonne 3, ligne 39 - ligne 43 * ---	1
A	US-A-5 159 049 (R. C. ALLEN) * colonne 7, ligne 25 - ligne 26 * ---	1
D,A	PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, vol.86, 1989 pages 2766 - 22770, XP310584 M. ORITA 'DETECTION OF POLYMORPHISMS OF HUMAN DNA BY GEL ELECTROPHORESIS AS SINGLE-STRAND CONFORMATION POLYMORPHISMS' * le document en entier * -----	1
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.-6)
		G01N
Date d'achèvement de la recherche		Examinateur
15 Mars 1995		Duchatellier, M
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons A : membre de la même famille, document correspondant</p>		

